

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Eliška Kubátová

Epigenetické mechanismy při vzniku závislosti na psychostimulantech
Epigenetic mechanisms in psychostimulant addiction

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé práce doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho cenné rady, vstřícnost a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě při sepisování této práce vytrvale podporovali.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 17. 7. 2021

Podpis

Abstrakt

Psychostimulanty patří mezi vysoce návykové látky, které působí na centra odměny v mozku zvýšením extracelulární hladiny monoaminů. Svou popularitu v západní společnosti získaly v průběhu 20. století a dodnes jsou přetrvávajícím společenským problémem. Závislost na nich představuje velmi obtížně řešitelnou situaci, terapie je velmi často neúspěšná a bývalí uživatelé se k těmto drogám velmi často vrací. Po podání těchto látek dochází ke změnám genové exprese, které mohou přetrvávat velmi dlouhou dobu od posledního užití drogy – často týdny až měsíce. Tato práce se zaměřuje na epigenetické změny, které probíhají v mozku po podání těchto návykových látek a které jsou spojené se vznikem závislosti.

Klíčová slova: Epigenetika, psychostimulanty, amfetamin, metamfetamin, kokain, závislost

Abstract

Psychostimulants are highly addictive substances that act in a brain reward center by increasing extracellular levels of monoamines. In western civilization, they have gained popularity during the 20th century. Psychostimulant addiction is a persistent social problem even today since therapy is often unsuccessful and former users relapse frequently. Alterations in gene expression occur after psychostimulant is administered. These changes are long-lasting as they can often persist for weeks and months. This work focuses on the epigenetic changes in a brain associated with the development of addiction after psychostimulant administration.

Key words: Epigenetics, psychostimulants, amphetamine, methamphetamine, cocaine, addiction

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
Úvod.....	3
1 Epigenetika – typy histonů a jejich modifikací, modifikace DNA.....	4
1.1 Typy histonů.....	4
1.2 Histonové modifikace.....	5
1.2.1 Metylace histonů	5
1.2.2 Acetylce histonů	5
1.2.3 Fosforylace histonů	6
1.3 Metylace DNA	6
1.4 Nekódující RNA (ncRNAs)	7
1.4.1 lncRNAs	7
1.4.2 sncRNAs.....	7
2 Psychostimulanty a mechanismy jejich účinku.....	8
2.1 Amfetaminy.....	10
2.1.1 Amfetamin (AMPH).....	10
2.1.2 Metamfetamin (METH).....	12
2.2 Kokain	12
2.3 Ostatní	13
3 Epigenetické mechanismy při vzniku závislosti.....	14
3.1 Role acetylce histonů při vzniku závislosti.....	14
3.1.1 Δ FosB.....	14
3.1.2 CREB protein	15
3.2 Role fosforylace histonů při vzniku závislosti	15
3.3 Role metylace DNA při vzniku závislosti	16
3.3.1 MeCP2.....	16
3.4 Role nekódující RNA při vzniku závislosti.....	16
3.4.1 miRNA	16
3.4.2 lncRNAs	18
Závěr.....	19
Seznam použité literatury	20

Seznam použitých zkratk

AMPH – amfetamin

AP-1 – aktivátorový protein 1

BDNF – mozkový neurotrofický faktor (brain-derived neurotrophic factor)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CDK5 – cyklin-dependentní kináza 5

CNS – centrální nervový systém

CpG – cytosin spojený fosfodiesterovou vazbou s guaninem ve vlákně DNA

CRE – element odpovědi na cAMP (cAMP response element)

CREB – protein vážající CRE (cAMP response element-binding protein)

DA – dopamin

DAT – dopaminový transportér

DNA – kyselina deoxyribonukleová

DNMTs – DNA metyltransferázy

GNATs – Gcn5 N-acetyltransferázy

HAT – histon acetyltransferáza

HCV – virus hepatitidy typu C

HDAC – histon deacetyláza

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti

IC – intracelulární

IMAO – inhibitor monoaminoxidázy

lncRNAs – dlouhé nekódující RNA

MAO – monoaminoxidáza

MDMA – 3,4-metylendioxymethamfetamin (extáze)

MDPV – 3,4-metylendioxypyrovaleron

MeCP2 – protein vázající metylovaný cytosin v CpG ostrůvcích (methyl-CpG binding protein 2)

METH – metamfetamin

mRNA – mediátorová RNA

miRNA, miR – micro RNA

NA – nucleus accumbens

NcoR1/2 – nuclear receptor co-repressor 1/2

ncRNAs – nekódující RNA

NET – noradrenalinový transportér

RNA – kyselina ribonukleová

SERT – serotoninový transportér

siRNA – krátké interferující RNA (short interfering RNAs)

sncRNAs – krátké nekódující RNA

VMAT 2 – vezikulární monoaminový transportér 2

Úvod

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o vlivu epigenetických modifikací na rozvoj a udržování závislosti na psychostimulantech. Účinky psychostimulantů jsou lidem známy již po tisíce let. Jako rostlinné produkty byly užívány domorodými kmeny v Jižní Americe a Africe. Od konce 19. století však začínaly tyto látky pronikat mezi běžnou populaci v Evropě a Americe s masivním rozmachem ve druhé polovině století dvacátého. Podle Evropské zprávy o drogách z roku 2020 ^[1] je i dnes v Evropě vysoká dostupnost ilegálních látek – v roce 2018 byl zaznamenán největší záchyt kokainu v Evropě v historii a jeho role na evropském černém trhu je čím dál větší. Zvyšují se i záchyty amfetaminu. Metamfetamin pro evropský trh se podle zprávy vyrábí z velké většiny v České republice a příhraničních oblastech. Tablety MDMA obsahují vyšší průměrné množství drogy, než obsahovaly dříve. Každý rok je hlášeno více než 50 nových psychoaktivních látek.

Kromě rizika předávkování s sebou drogová závislost nese i mnoho dalších přidružených rizik, jako jsou například finanční rizika, emoční rizika spojená se zhoršením rodinných nebo přátelských vztahů či riziko přenosu některých infekcí při používání nesterilních injekčních stříkaček – například viru HIV nebo HCV.

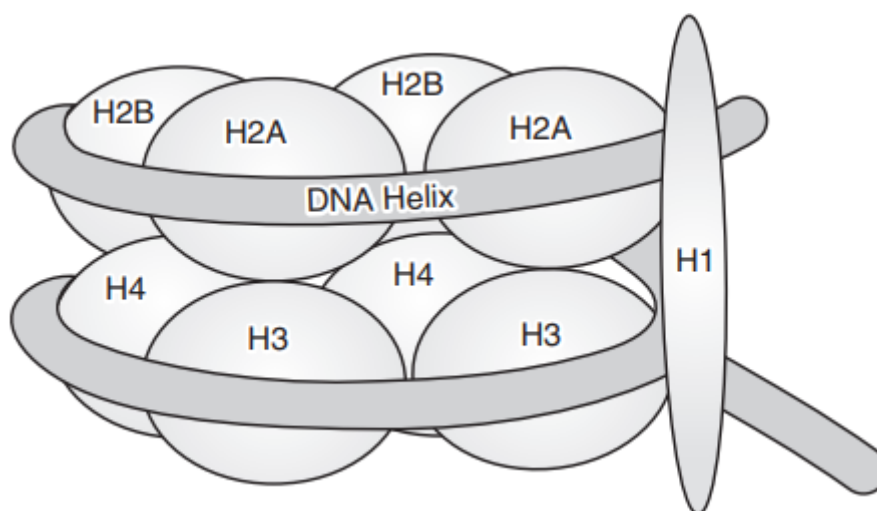
I toto jsou důvody, proč je výzkum molekulárních událostí odehrávajících se v mozku při vzniku závislosti důležitý. Pochopení mechanismů skrývajících se za rozvojem závislosti by nám mohlo otevřít dveře k novým a účinnějším přístupům v léčbě. V současné době se léčba závislosti na psychostimulantech provádí převážně pomocí kognitivně behaviorální terapie. Výzkumy ale bohužel ukazují, že značná část pacientů se následně k užívání vrátí. Například výzkum z roku 2014 uvádí, že ze vzorku čítajícího 350 abstinujících uživatelů METH se 61 % vrátilo k užívání drogy během prvního roku abstinence a pouhých 13 % dokázalo abstinovat po dobu alespoň pěti let (Brecht & Herbeck, 2014). Z hlediska léčby farmaky existuje několik slibných kandidátů, například Naltrexon. Další naděje na budoucí snazší léčbu závislosti a prevenci jejího relapsu existuje v podobě vakcíny proti závislosti na METH, která se v současné době vyvíjí a která prostoupila do první fáze klinických studií (Hossain et al., 2020).

V první kapitole bude shrnuta problematika epigenetiky a budou zde popsány některé epigenetické modifikace. Druhá kapitola obsahuje poznatky o základním rozdělení psychostimulantů a o molekulárních mechanismech jejich účinku. Třetí kapitola pojednává o vztahu epigenetiky a drogové závislosti, ukazuje epigenetické mechanismy a transkripční faktory, které se podílí na rozvoji a udržování závislosti na psychostimulantech.

1 Epigenetika – typy histonů a jejich modifikací, modifikace DNA

Epigenetické modifikace označují takové změny fenotypu a genové exprese, které se mohou přenášet na dceřiné buňky v průběhu mitotického dělení, ale nenastávají vlivem změny sekvence DNA (Waterland, 2006). V širším významu můžeme tímto výrazem označovat i dlouhodobé změny v genové expresi jedné buňky (Gibney & Nolan, 2010). Mezi hlavní epigenetické modifikace řadíme metylaci DNA a modifikace histonů.

V buňce v nativním stavu nacházíme DNA v jádře ovinutou kolem histonů – spolu tvoří komplex zvaný nukleozom. Nukleozom se skládá z histonů H2A, H2B, H3 a H4 kolem kterých je ovinuto 145 až 147 párů bazí DNA, tvořících zhruba 1,65 otáčky (Arents et al., 1991). Histony jsou oktamerní bazické proteiny, rozlišujeme pět základních typů histonů – H1, H2A, H2B, H3A a H4. Jednotlivé nukleozomy jsou vzájemně propojeny úsekem linkerové (spojovací) DNA, který je dlouhý v řádu desítek párů bazí. Délka tohoto úseku je mezidruhově i vnitrobuněčně variabilní (Szerlong & Hansen, 2011) Schématická stavba nukleozomu je znázorněná na obr. 1.



Obr. 1: Schéma nukleozomu, převzato z [II]

V závislosti na rozvolněnosti DNA rozlišujeme dva základní stavy - tzv. euchromatin, který je transkripčně aktivní a heterochromatin, který je transkripčně inaktivní. Rozvolněnost DNA na histonech může být pozmeněna vlivem epigenetických modifikací histonů.

1.1 Typy histonů

Jak bylo uvedeno výše, základně členíme histony na 5 typů – H1, H2A, H2B, H3 a H4. Histony H2A, H2B, H3 a H4 tvoří oktamerní jádro nukleozomu způsobem znázorněným na obr. 1. Histon H2A tvoří dimer s histonem H2B, histon H3 tvoří dimer s histonem H4, v jádru nukleozomu nacházíme po dvou

dimerech obou typů (Kornberg, 1974; Thomas & Kornberg, 1975). Histony jádra nukleozomu jsou v evoluci eukaryot velmi silně konzervovány. Všechny histony jádra nukleozomu mají podobnou strukturální stavbu – vždy mají globulární hydrofobní vnitřní část a N-konec vyčnívající na povrch, právě ten je cílem mnoha post-translačních modifikací (Cosgrove, 2007).

Jak je také patrné z obrázku 1, histon H1 netvoří jádro nukleozomu, ale nachází se po jeho boku, kde asociuje s linkerovou DNA tak, že spojuje místo vstupu a výstupu DNA do/z nukleozomu, čímž přispívá ke stabilizaci celé nukleozomální struktury. Na jeden nukleozom vždy připadá jeden histon H1. Dnes je jasné, že hraje svou roli i v regulaci transkripce, a to několika mechanismy, z nichž ne všechny jsou kompletně jasné. Jedním z mechanismů, jakým přispívá k regulaci transkripce je skutečnost, že i pouhou stabilizací DNA způsobí horší přístupnost transkripčních faktorů k této DNA, takže působí jako represor transkripce (Cheung et al., 2002).

1.2 Histonové modifikace

Posttranslační histonové modifikace jsou jedním ze způsobů ovlivnění genové exprese v buňce. Je známo více různých typů histonových modifikací – kromě těch uvedených níže v textu ještě například sumoylaci či ubiquitinaci a je známo velké množství enzymů podílejících se na přidávání či odstraňování jednotlivých značek. Jeden histon může nést zároveň více různých modifikací na různých aminokyselinových zbytcích a tyto značky tvoří dohromady komplexní soubor informací.

1.2.1 Metylace histonů

Methylace histonů má v porovnání s ostatními histonovými modifikacemi velmi dlouhou střední délku života, která se zde pohybuje v rámci dní (ale například u acetylace je to necelých 15 minut) (Barth & Imhof, 2010). I proto byla dříve velmi rozšířená představa, že tato post-translační modifikace je nevratná. Může probíhat na argininu a lysinu, přičemž lysin může být mono-, di-, či trimetylovaný a arginin monometylovaný a dimetylovaný symetricky či asymetricky.

Enzymy přidávající na zbytky aminokyselin metylové skupiny nazýváme histon metyltransferázy. Rozeznáváme tři velké rodiny histon metyltransferáz – dvě z nich přidávají metylovou skupinu na lysin, třetí přidává metylovou skupinu na arginin. Enzymy odnímající metylovou skupinu z histonů nazýváme histon demetylázami a tyto byly objeveny teprve relativně nedávno. Zde známe v současné době dvě rodiny enzymů, jedna z nich působí na lysinu, druhá na lysinu i argininu (Pattaroni & Jacob, 2013). Její efekt na aktivaci či inaktivaci transkripce je silně závislý na stupni metylace a také na kontextu ostatních modifikací nacházejících se v jejím okolí (Lee et al., 2010).

1.2.2 Acetylace histonů

Acetylace histonů nukleozomového jádra obecně zvyšuje přístupnost transkripčního aparátu k molekule DNA, čímž zvyšuje pravděpodobnost transkripce – přispívá k tvorbě euchromatinu (Lee et al., 1993). Děje se tak proto, že acetylace lysinu zeslabuje elektrostatické interakce mezi histony a DNA, která má

negativní náboj. Deacetylase naopak snižuje pravděpodobnost transkripce a tím přispívá k tvorbě heterochromatinu. Přejchod mezi acetylovaným a neacetylovaným stavem zajišťují dvě skupiny enzymů – histon acetyltransferázy (HATs) a histon deacetylázy (HDACs).

HDACs můžeme rozdělit do dvou velkých skupin neboli rodin (De Ruijter et al., 2003):

- SIR2 rodina
- klasické HDACs
 - třída I
 - HDAC1, 2, 3, 8
 - třída II
 - HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10

HATs jsou evolučně konzervované enzymy, které mají zpravidla více podjednotek. Vlastní histon acetyltransferázovou aktivitu však mohou mít i některé transkripční faktory jako například CREB protein, o kterém je blíže pojednáno v Kapitole 3. HATs přenášejí acetylovou skupinu na lysin z acetylkoenzymu A. Funkce katalytické podjednotky závisí ve velké míře na ostatních podjednotkách v enzymu. Podle typu jejich katalytické podjednotky je můžeme rozdělit do následujících skupin (Lee & Workman, 2007):

- Gcn5 N-acetyltransferázy (GNATs)
 - Gcn5, PCAF, Elp3, Hat1, Hpa2, Nut1
- MYST HATs
 - Morf, Ybf2, Sas2, Tip60

Přejchod mezi acetylovaným a neacetylovaným stavem může mít celou řadu příčin – může zde hrát roli například neurochemická signalizace, environmentální faktory, ale také procesy učení či vznikající drogová závislost (Shen et al., 2008).

1.2.3 Fosforylace histonů

Fosforylace histonů je další modifikací, která je spíše spojována s aktivací genové transkripce. Například fosforylace H3S10 dokáže vyvolat změny ve struktuře chromatinu navozující spíše euchromatinové uspořádání (Deng et al., 2008). Fosforylovány mohou být aminokyselinové zbytky serinu, tyrosinu a threoninu. Histonovou fosforylací zajišťují histon kinázy, defosforylace je zajišťována histon fosfatázami.

1.3 Metylace DNA

Methylace DNA je jedním ze základních mechanismů modifikace genové exprese. DNA metylace je například zodpovědná za inaktivaci neboli silencing jednoho X chromozomu v buňce ženského

organismu. Z toho již vyplývá, že metylace DNA zpravidla způsobuje snížení genové exprese v dané oblasti i když toto tvrzení rozhodně neplatí absolutně (A. P. Bird & Wolffe, 1999).

DNA metylace probíhá na cytosinu v dinukleotidu CpG a je zajišťovaná enzymy DNA metyltransferázami (DNMTs). CpG ostrůvky jsou repetitivní oblasti těchto dinukleotidů a jsou zpravidla lokalizovány v promotorových oblastech genů. CpG ostrůvky jsou zpravidla nemetylované, což umožňuje navázání transkripčních faktorů (Bird, 2002). Po jejich metylaci buď k vazbě faktorů dojít nemůže, což způsobí umlčení daného promotoru nebo jsou na metylované úseky rekrutovány další proteiny (například MeCP2), které interakcí s dalšími molekulami způsobí inaktivaci promotoru (Hendrich & Bird, 1998).

Toto je samozřejmě pouze jeden z mechanismů modifikace genové exprese, a proto i geny, které nemají metylovaný CpG promotor nemusejí být nutně aktivní.

1.4 Nekódující RNA (ncRNAs)

Nekódující RNA je taková RNA, která není určena k translaci a tím pádem nekóduje žádné proteiny. Nekódující RNA můžeme rozdělit na krátké a dlouhé. Úloha těchto typů RNA byla dlouho neznámá, ale nyní se ukazuje, že obzvláště dlouhé nekódující RNA (lncRNAs) by mohly mít zásadní vliv na regulaci transkripce a translace v buňce (Khalil et al., 2009; Loewer et al., 2010). Mezi krátké nekódující RNA řadíme například microRNAs (miRNA) a short interfering RNAs (siRNA).

1.4.1 lncRNAs

Jako lncRNA označujeme takové ncRNAs, které jsou delší než 200 nukleotidů. Savčí genom kóduje tisíce různých lncRNAs. V současné jsou době velmi zkoumanou kategorií molekul. Ukazuje se, že hrají významnou roli v regulaci mnoha fyziologických procesů, jako je například transkripce, buněčná diferenciace nebo modifikace chromatinu (Ponting et al., 2009).

Regulaci exprese ovlivňují navázáním na sekvenčně odpovídající úseky DNA. Toto působení může mít *cis*- i *trans*- charakter. Po navázání na DNA slouží jako molekulární lešení na které se mohou dále navazovat regulační proteiny (Kornienko et al., 2013).

1.4.2 sncRNAs

Klasickým zástupcem této skupiny molekul je miRNA, jak už bylo uvedeno výše. Tyto molekuly mají schopnost se navazovat na molekuly mRNA s komplementární sekvencí, čímž produkují signál k degradaci dané molekuly. Podílejí se tedy na posttranskripčním umlčování daných genů.

2 Psychostimulanty a mechanismy jejich účinku

Jako psychostimulanty obecně označujeme látky, které působí excitačně na CNS. Tato práce je zaměřená především na kokain, amfetamin (AMPH) a metamfetamin (METH), ale mezi látky s psychostimulačním účinkem bychom mohli zařadit i MDMA (extáze). Dále rozpracované poznatky se budou týkat pouze kokainu, AMPH a METH, pokud nebude výslovně uvedeno jinak.

Mnoho psychostimulantů (např. kokain, amfetaminy) zpravidla u svých uživatelů nevyvolává fyzickou závislost, ale vyvolává závislost psychickou, která se stává hlavní motivací pro opakované dlouhodobé užívání látky (Deneau et al., 1969). Navíc se zde objevují další rizikové fenomény, například efekt behaviorální senzitivace, který zvyšuje riziko relapsu i po dlouhodobé abstinenci. Tento jev může podle některých teorií stát za neustálým bažením (anglicky craving) po droze a v některých případech může být u uživatelů permanentním důsledkem užívání drog (Robinson & Berridge, 1993).

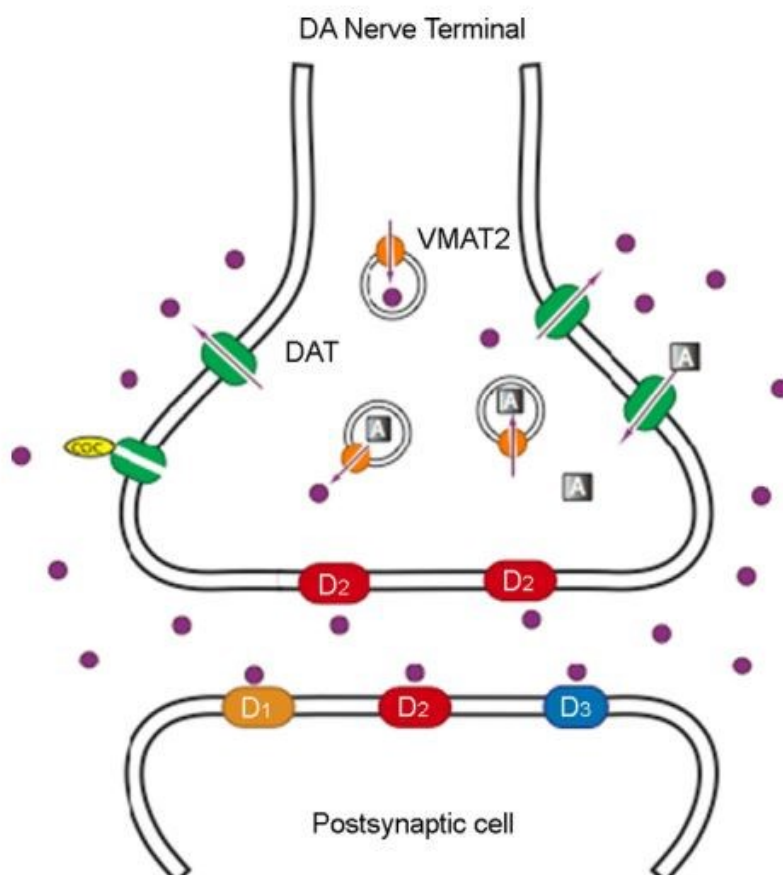
Nejobvyklejšími bezprostředními účinky psychostimulantů jsou snížení únavy, dobrá nálada až euforie, zvýšená tepová frekvence a zvýšený krevní tlak, snížení chuti k jídlu, rozšíření zorniček, zvýšená tělesná teplota a krátkodobě zvýšená schopnost pozornosti. Mezi časté vedlejší efekty patří například zvýšená úzkost.

Základním mechanismem účinku psychostimulantů je zvýšení extracelulární hladiny neurotransmiterů ze skupiny monoaminů – dopaminu (DA), serotoninu a noradrenalinu v mezolimbické dráze a v nucleus accumbens (NA), čímž se aktivuje systém odměny (Deneau et al., 1969; Di Chiara & Imperato, 1988; Ritz et al., 1990). V případě DA je pro dosažení zvýšené extracelulární hladiny důležité omezení jeho zpětného toku do buňky - tzv. re-uptake. Ten probíhá za normálních podmínek pomocí dopaminového transportéru (DAT) symportem s dvěma ionty Na^+ a jedním Cl^- a je přítomností stimulantů výrazně ovlivněn (Butcher et al., 1988; Kuhar et al., 1991). Analogicky je serotonin vychytáván transportérem SERT a noradrenalin transportérem NET.

Psychostimulanty jsou látky s velmi silným neurotoxickým potenciálem. Za jejich neurotoxicitou stojí několik různých mechanismů. Jeden z nich souvisí přímo s jejich schopností zvyšovat EC koncentraci DA. V dlouhodobém měřítku vede tato zvýšená koncentrace k poškození dopaminergních neuronů, například k úbytku DAT či D2 receptorů (Volkow et al., 2001a; Volkow et al., 2001b). Psychostimulanty působí jako neurotoxiny také kvůli tomu, že zvyšují produkci kyslíkových radikálů, tudíž vyvolávají zvýšený oxidativní stres (Cubells et al., 1994).

Podle toho, jakým způsobem působí psychostimulanty na DAT, je můžeme rozdělit do dvou základních skupin. Schematicky znázorněné vidíme oba mechanismy na obrázku 2. První z nich jsou inhibitory zpětného toku DA do buňky, kde je typickým zástupcem kokain. Na obrázku 2 vidíme kokain (označen jako „coc“) navázaný na DAT v levé části obrázku. Druhá skupina se také váže na DAT, ale zároveň je s jeho pomocí přenesena do buňky (slouží jako substrát pro DAT), kde může působit dalšími

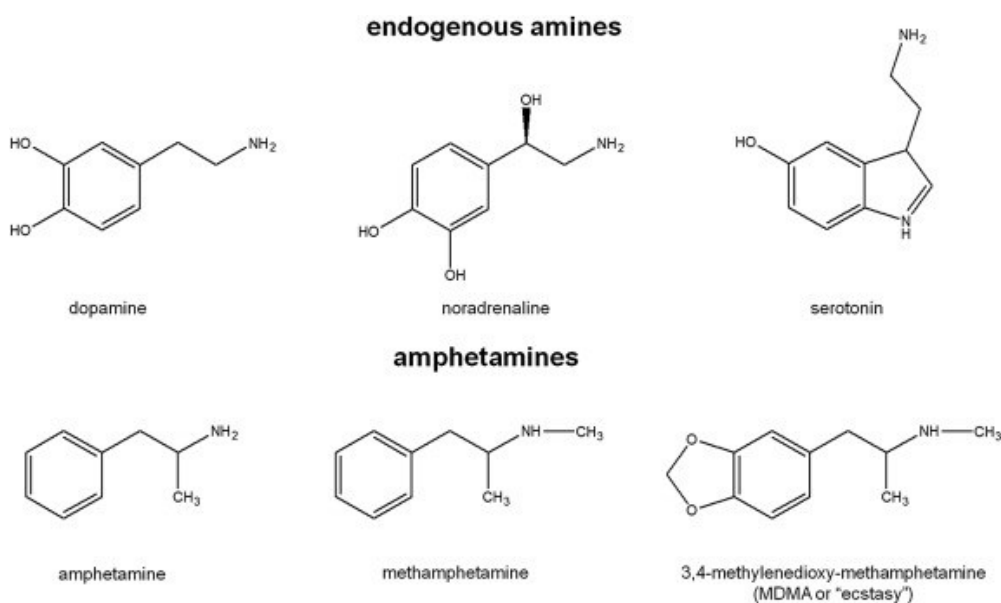
mechanismy na zvýšené uvolňování intracelulárního DA – tímto způsobem působí amfetamin a metamfetamin (Fleckenstein et al., 2000; Rothman et al., 2001). V pravé a střední části obrázku 2 vidíme účinky AMPH (zde označen „A“). AMPH se pomocí DAT dostává do buňky a dále se pomocí VMAT 2 dostává do synaptických váčků. Na dolní části obrázku vidíme postsynaptickou buňku s několika typy receptorů pro dopamin (Howell & Kimmel, 2008).



Obr. 2: Mechanismus účinku kokainu ("coc") a amfetaminu ("A") na DAT a VMAT2. D1-D3 označují dopaminové receptory, fialové tečky znázorňují molekuly dopaminu. Bližší popis mechanismu je uveden v hlavní části textu. Převzato z (Howell & Kimmel, 2008)

2.1 Amfetaminy

Do této skupiny látek řadíme mimo jiné právě AMPH a METH, které mají velmi podobnou chemickou strukturu. Ta se skládá z fenylového kruhu, který je spojený s amino skupinou dvouuhlíkatým postranním řetězcem, který má na jednom uhlíku metylovou skupinu. Z obrázku 3 je zřejmé, že obě látky mají chemickou strukturu podobnou dopaminu – v METH, AMPH i DA je fenyletylamin, což je důležité pro pochopení mechanismu jejich účinku (Simola & Carta, 2016).



Obr. 3: Chemická struktura endogenních aminů (nahore) a vybraných amfetaminů (dole), převzato z (Simola & Carta, 2016)

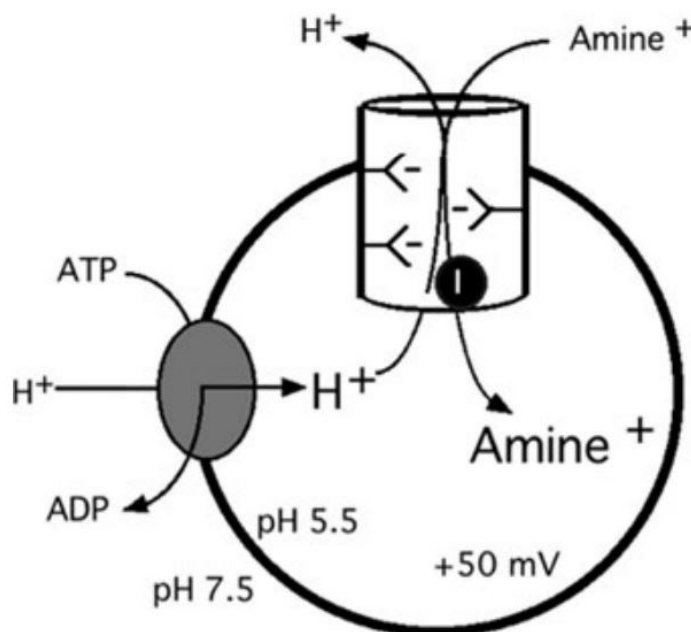
2.1.1 Amfetamin (AMPH)

Amfetamin má více různých mechanismů účinku, kterými zvyšuje extracelulární koncentraci DA. První z nich spočívá ve schopnosti AMPH působit na VMAT2. VMAT2 jsou vnitrobuněčné receptory umístěné na synaptických váčcích, které se uplatňují při naplňování těchto váčků monoaminy. AMPH je dále schopen převrátit funkci DAT. Ten tedy místo toho, aby zajišťoval reverzní transport DA do buňky, začne DA vyplavovat do extracelulárního prostoru. Zde pak DA působí na receptory na membráně postsynaptického neuronu a vzniklý vzruch je přenesen dál (Fleckenstein et al., 2007).

2.1.1.1 Inhibice zpětného vychytávání katecholaminů a otočení funkce DAT

V mozku jsou katecholaminy po vylití synaptického váčku do synaptické štěrbině účinně zpětně vychytávány. DA je zpětně vychytáván do presynaptických neuronů pomocí DAT na plazmatické membráně. DAT může zaujímat dvě různé konformace – první z nich, kdy je transportér „otočený“ směrem ven, a druhá, kdy je otočen dovnitř. AMPH je ale také substrátem pro DAT a pomocí něj se dostává do buňky. Pro otočení funkce DAT, kdy místo zpětného vychytávání nastává eflux DA do

synaptické štěrby, je velmi pravděpodobně nezbytná fosforylace jednoho nebo i více serinů na N-konci DAT (s největší pravděpodobností Ser7 nebo Ser12) (Khoshbouei et al., 2004).



Obr. 4: Mechanismus plnění váčků monoaminy, převzato z (Eiden & Weihe, 2011)

2.1.1.2 Interakce se synaptickými váčky – inhibice VMAT2

VMAT2 ((Vesicular monoamine transporter 2)) je přenašeč, který využívá energii získanou antiportem dvou protonů z lumen váčku k přenesení jedné molekuly monoaminu z cytoplazmy do synaptického váčku, jak je znázorněno na obrázku 4. V synaptickém váčku je pH nižší než v cytosolu. (Eiden & Weihe, 2011; Henry et al., 1994; Johnson, 1988).

Podle modelu slabé báze (weak base model) AMPH rozruší tuto rovnováhu a znemožní tak přesun monoaminu do váčku, čímž se zvýší jeho IC koncentrace (Sulzer & Rayport, 1990). AMPH je totiž lipofilní slabou bází a v lumen synaptického váčku je kyselé prostředí. Podle této hypotézy se AMPH dostává do váčku difúzí přes membránu. Poté, co se AMPH dostane do váčku na sebe začne vázat protony, čímž zničí elektrochemický gradient protonů, který je potřebný pro přenos monoaminu do váčku.

Další studie naznačují, že by AMPH a METH mohly mít ještě jeden mechanismus účinku v souvislosti s přenašečem VMAT2, a to jeho redistribuci v rámci jednotlivých buněk (Eyerman & Yamamoto, 2005; Riddle et al., 2002). Obě citované studie uvádějí pokles imunoreaktivity VMAT2 v oblasti cytoplazmy

bohaté na synaptické váčky po užití METH. Pokles imunoreaktivity signalizuje úbytek tohoto přenašeče ve zkoumaných buňkách.

2.1.1.3 Inhibice MAO

Další mechanismus, který přispívá ke zvýšení extracelulární hladiny dopaminu, je schopnost amfetaminu inhibovat monoaminoxidázy (MAO). MAO je skupina enzymů lokalizovaná ve vnější mitochondriální membráně, která se uplatňuje při inaktivaci monoaminů v nervových buňkách.

Ačkoliv je tento mechanismus účinku AMPH znám již poměrně dlouho, je nepravděpodobné, že by sám o sobě měl ve zvyšování extracelulární koncentrace výraznější roli, protože AMPH je pouze slabým inhibitorem MAO (Heal et al., 2013; Mantle et al., 1976). Zde je tento mechanismus uveden pouze pro úplnost a dotvoření prezentace AMPH jakožto molekuly s více různými farmakologickými mechanismy účinku.

2.1.2 Metamfetamin (METH)

Metamfetamin má chemickou strukturu velmi podobnou amfetaminu, a proto je mechanismus jeho účinku velmi podobný. Některé studie ovšem naznačují, že METH je návykovější a má větší stimulační potenciál (Goodwin et al., 2009). Chemicky se METH od AMPH liší tím, že má navíc methylovou skupinu, což má za následek jeho snazší prostup hematoencefalickou bariérou a také vyšší rozpustnost v tucích (Zorick et al., 2010).

Podle Světové zprávy o drogách z roku 2021 ^[11] je METH ve světě nejrozšířenějším amfetaminem. Mezi zeměmi, kde se tato látka vyrábí, navíc Česká republika a její příhraniční oblasti i podle Evropské zprávy o drogách zpravidla zabírá přední příčky.

2.2 Kokain

Kokain působí inhibicí zpětného toku DA do buňky zablokováním jeho transportéru DAT – je tedy kompetitivním inhibitorem DA (Ritz et al., 1988). Důležité je, že při tom nedochází k transportu kokainu do buňky. Zároveň stejným způsobem blokuje i vstup serotoninu a noradrenalinu, které jsou za normálních okolností také z extracelulárního prostoru vychytávány příslušnými přenašeči (Ritz et al., 1990).

Důležitou roli při vzniku závislosti na kokainu hraje protein BDNF. Ten se vyskytuje jako homodimer a může působit na dva různé transmembránové receptory – prvním z nich je vysokoafinní tyrosinkinázový receptor, druhým z nich je nízkoafinní neurotrofinový receptor (Anderson et al., 1995; Klein et al., 1991). Opakované užívání kokainu vede ke zvýšení hladiny tohoto faktoru, což vede k zesílení aktivity v částech mozku spojených s centry odměny. BDNF se také výrazně podílí na vzniku behaviorální senzitivace u myšího modelu (Filip et al., 2006).

2.3 Ostatní

Mezi další látky řadící se do skupiny psychostimulantů řadíme například MDMA neboli extázi, jejíž mechanismus účinku spočívá především ve zvýšení extracelulární hladiny serotoninu působením na SERT.

Další kategorii psychoaktivních látek tvoří nové psychoaktivní látky (v literatuře novel psychoactive substances). Tyto látky mají strukturu podobnou amfetaminu a chemicky se řadí mezi syntetické katinony. Mezi tyto látky se řadí například mefedron, MDPV a metylon.

3 Epigenetické mechanismy při vzniku závislosti

Role epigenetických mechanismů při vzniku závislosti byla velmi dlouho přehlížena, a proto je tato vědecká oblast stále ještě v začátcích. Přitom pochopení dlouhodobých účinků těchto látek na lidský organismus by mohlo přispět k objevení nových typů léčby závislosti.

Nervové buňky mají jedinečnou schopnost reagovat a adaptovat se v závislosti na zkušenostech, kterými si daný organismus prošel – tento jev se nazývá neuroplasticita. Proto můžou aktivity, jakými jsou třeba proces učení nebo drogová zkušenost, dlouhodobě měnit fungování mozku. Na molekulární úrovni se tyto mechanismy uplatňují pomocí změn epigenomu.

Dnes už je známo, že obzvláště dlouhodobé užívání psychostimulantů působí velmi dlouho přetrvávající změny v podstatě na všech úrovních organismu – od behaviorálních změn přes změny morfologie dopaminergních neuronů v NA až ke změnám genové exprese v těchto buňkách (Robinson & Kolb, 1997).

3.1 Role acetylace histonů při vzniku závislosti

Acetylace histonů je v současné době nejčastěji pozorovaná epigenetická změna ve vztahu k rozvoji závislosti (Carvelli et al., 2015). Například užívání kokainu je spojeno s celkově zvýšenou acetylací histonů H3 a H4 v NA (Kumar et al., 2005; Wang et al., 2010).

Existují důkazy, že by hyperacetylace histonů mohla mít zásadní vliv při rozvoji behaviorální senzitivace, jak bylo ukázáno v pokusu s použitím HDAC inhibitorů (Kalda et al., 2007). V tomto experimentu bylo prokázáno, že užívání AMPH způsobilo zvýšenou acetylaci na histonu H4, která byla ještě výraznější po přidání HDAC inhibitorů, což vedlo k vyšší behaviorální senzitivaci.

3.1.1 Δ FosB

FOS proteiny tvoří heterodimer navázáním na některý z rodiny JUN proteinů, čímž vytváří transkripční faktor AP-1. Rodina Fos proteinů je ve studiích opakovaně identifikována, jako jeden z hlavních transkripčních faktorů, který se uplatňuje při změnách genové exprese následujících po vystavení návykovým látkám (Graybiel et al., 1990; Young et al., 1991). Tyto studie zároveň ukazují, že stačí i jedna dávka drogy (v tomto případě AMPH a kokainu), aby se exprese proteinu c-Fos přechodně výrazně zvýšila.

Při dlouhodobějším užívání se hladina proteinu c-Fos snižuje, ale naopak protein Δ FosB svoji expresi zvyšuje a hladina tohoto proteinu zůstává vyšší i po několikadenním neužívání drogy (Hope et al., 1994). Protein Δ FosB je kratší sestříhovou variantou proteinu FosB a jeho hladina v mozku je zvýšená i několik týdnů, protože má relativně dlouhou životnost (Chen et al., 1997). V současnosti existují teorie, které tvrdí, že právě protein Δ FosB může být zodpovědný za vznik chronické závislosti na droze, kterou

uživatel předtím užíval pouze rekreačně a že může sloužit jako „molekulární přepínač genové exprese“ (Nestler et al., 2001).

Po užití kokainu byla sledována zvýšená exprese proteinů z rodiny Fos v NA, která je asociována s hyperacetylací histonu H4 v promotorových oblastech příslušných genů (Kumar et al., 2005; Levine et al., 2005). Ve zde zmíněné studii, kterou provedli Kumar et al. (2005) byla pozorována acetylace histonu H4 a fosfoacetylace histonu H3 v promotorové oblasti genu pro protein c-Fos již 30 minut po podání kokainu. V průběhu následujících 3 hodin se obě tyto změny vrátily zpět na kontrolní hladiny a zůstaly tak beze změny po následujících 24 hodin, kdy už modelům žádná další dávka drogy podána nebyla. Po podání AMPH byly pozorovány velice podobné změny v genové expresi, jako po podání kokainu. Hyperacetylace probíhá i při chronickém užívání kokainu, například na histonu H3 v promotorových oblastech genů pro CDK5 a BDNF nebo na histonu H4 v promotoru genu pro protein FosB (Kumar et al., 2005).

3.1.2 CREB protein

CREB protein je transkripčním faktorem, který je po aktivaci fosforylaci na Ser133 schopen se v dimerech navazovat na CRE v promotorech cílových genů. CRE jsou úseky DNA nacházející se zpravidla na 5' konci, které mají evolučně velmi konzervovanou sekvenci (Lonze & Ginty, 2002; Shaywitz & Greenberg, 1999). Výzkumy ukazují, že CREB protein může ovlivňovat expresi asi až 4000 genů, což z něj činí velmi významný transkripční faktor s dalekosáhlým dopadem (Zhang et al., 2005). CREB protein může být fosforylován více různými kinázami, například protein kinázou A či Ca^{2+} /kalmodulin kinázou.

Bylo dokázáno, že amfetamin i kokain dokáží u chronických uživatelů indukovat fosforylaci CREB proteinu, čímž dochází k celkovému zvýšení jeho aktivity a potažmo i k následné modifikaci genové exprese u mnoha dalších genů – jedním z nich je například již výše zmíněný gen pro c-Fos protein (Konradi et al., 1994).

Zvýšená aktivita CREB proteinu může způsobovat velmi rozsáhlé behaviorální změny. Bylo prokázáno, že zvýšená aktivita CREB proteinu je zodpovědná za sníženou odpověď mozku na pozitivní i negativní stimuly a vice versa (Barrot et al., 2002; McClung & Nestler, 2003).

Molekulární mechanismus jeho fungování je založen jednak na tom, že má vlastní histon acetyltransferázovou (HAT) aktivitu, dalším mechanismem funkce je jeho schopnost rekrutovat HATs ke genovému promotoru (Bannister & Kouzarides, 1996).

3.2 Role fosforylace histonů při vzniku závislosti

O tom, jak významnou roli má při vzniku závislosti fosforylace histonů stále není známo příliš mnoho, nicméně existují studie pozorující přechodně zvýšenou fosforylaci na histonu H3 po užití AMPH (Rotllant & Armario, 2012) a také studie pozorující zvýšenou fosforylaci histonu H3 na promotoru genu

pro Fos protein po užití kokainu (Brami-Cherrier et al., 2005). Oba tyto výzkumy jsou konzistentní s daty uvedenými výše, totiž že v promotoru pro c-Fos je fosforylace histonu H3 nejvýraznější 30 minut po podání drogy s následující klesající tendencí až ke kontrolním hladinám.

3.3 Role metylace DNA při vzniku závislosti

Na to, jakou roli metylace DNA při vzniku závislosti hraje, se v nedávné době zaměřovalo více studií. Při pokusech s kokainem se například ukázalo, že inhibice DNMTs způsobí pozdější vznik behaviorální senzitivace (Anier et al., 2010). Naopak, pokud je jedinci podán S-adenosylmethionin (látko stimulující metylaci DNA), tak se senzitivace vůči kokainu zvyšuje (Anier et al., 2013).

Dlouhodobé změny v genové expresi může způsobit kokain obzvláště pokud je podán adolescentním jedincům (Black et al., 2006). V této studii je ukázáno, že po podání kokainu adolescentním jedincům u nich byly i v dospělosti pozorovány snížené metylace na histonu H3, konkrétně na pozicích H3 (K4) a H3 (K27).

3.3.1 MeCP2

MeCP2 je jaderný protein, který se váže na metylovaný cytosin v řetězci DNA. Je přítomný u všech obratlovců a obzvláště u savců má velmi konzervovanou strukturu (Guy et al., 2011). Jeho exprese je nejvýraznější v mozku, plicích a slezině (Shahbazian et al., 2002).

MeCP2 funguje v mozku jako velmi důležitý regulátor genové exprese a po navázání na metylovaný úsek DNA může spolupracovat s mnoha dalšími proteiny (Ragione et al., 2016). Ačkoliv může mít i aktivační funkci, je u něj častější funkce inaktivační. V plnění této funkce je velmi důležitá spolupráce například s komplexem NCoR1/2, které obsahují HDACs, které způsobí umlčení daného genového úseku a jeho převedení na heterochromatin.

Přesný mechanismus, jakým se uplatňuje v rozvoji drogové závislosti je zatím stále nejasný, ale z již existujících studií vyplývá, že by MeCP2 mohl mít velmi důležitou roli (Deng et al., 2010; Im et al., 2010). Jedna z těchto studií se věnuje jeho roli při rozvoji závislosti na amfetaminu, druhá při rozvoji závislosti na kokainu. Jak AMPH, tak kokain spouští signalizační kaskády vedoucí k fosforylaci MeCP2 pravděpodobně působením na třídu D1 dopaminových receptorů na povrchu neuronu, čímž způsobují jeho aktivaci. Obě tyto studie se shodují v tom, že MeCP2 by mohl být důležitý při takzvané behaviorální senzitivaci, což je proces zvyšující odpověď organismu, při kterém vlivem neuroadaptačních změn dochází k tomu, že i malá dávka podaná v průběhu abstinence výrazně zvyšuje pravděpodobnost relapsu.

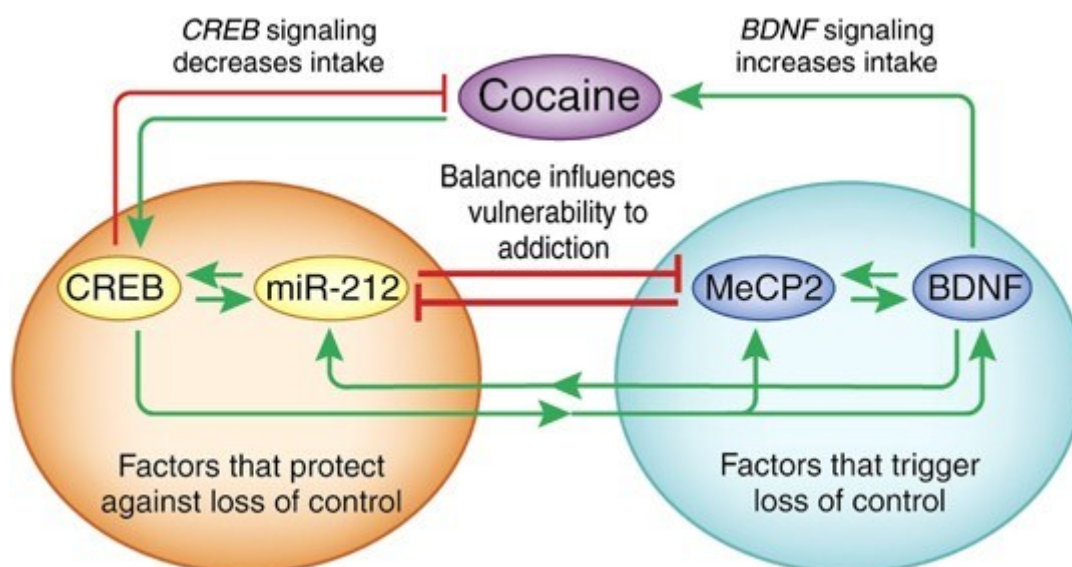
3.4 Role nekódující RNA při vzniku závislosti

3.4.1 miRNA

Ani role miRNA při vzniku závislosti není ještě plně pochopena, ale některé studie ukazují, že by mohla sehrávat velmi důležitou roli. V současné době je známo několik set miRNA, které by se na drogové

závislosti mohly podílet. Je však nutno podotknout, že mnoho miRNA však ještě stále čeká na své objevení, tudíž je zde ještě prostor pro mnohá další zkoumání.

Při vzniku závislosti na kokainu byl pozorován vznik homeostatických interakcí mezi miRNA a transkripčním faktorem MeCP2 (Im et al., 2010). V této studii zkoumající efekty kokainu bylo pozorováno, že mezi miR-212 a MeCP2 existuje systém negativní zpětné vazby, který zároveň nepřímo ovlivňuje i hladinu BDNF, která má výrazný vliv na intenzitu užívání drogy. Tato komplexní signalizační kaskáda je znázorněna na obrázku 5 (Jonkman & Kenny, 2013). Vidíme zde, že užívání kokainu vede ke zvýšení hladiny CREB, který, jak bylo uvedeno výše, způsobí snížení behaviorální odpovědi na pozitivní i negativní stimuly, což vede ke snížení potřeby užívat drogu opakovaně. Bylo pozorováno, že exprese miR-212 je zvýšená u potkanů, kteří mají zkušenost s užíváním kokainu (Hollander et al., 2010). Tato mi-RNA působí tak, že výrazně amplifikuje efekt, jaký má droga na CREB signalizační kaskádu. CREB protein na druhou stranu také zvyšuje expresi miR-212. Další vrstvu regulace představuje již zmíněná interakce s transkripčním faktorem MeCP2. Kokain indukuje zvýšenou expresi faktoru MeCP2 a ten následně jako transkripční represor působí negativně na expresi miR-212 (Cassel et al., 2006; Im et al., 2010). Posledním faktorem hrajícím roli v této soustavě interakcí je BDNF, jehož hladina výrazně koreluje s hladinou MECP2 (Abuhatzira et al., 2007; Chang et al., 2006). BDNF poté zvyšuje potřebu drogu užívat, protože jeho zvýšená aktivita je spojená s aktivací center odměn v mozku a vznikem behaviorální senzitivace. Celá tato souhra vzájemných interakcí určuje konečnou pravděpodobnost vzniku závislosti. Změny v expresi miRNA v NA byly pozorovány i v pokusech s METH (Sim et al., 2017; Zhu et al., 2015). Změny v expresi miRNA způsobené užíváním METH mohou přispívat ke změnám metabolismu neuronů.



Obr. 5: Souhra různých epigenetických faktorů při vzniku závislosti na kokainu. Detailní popis je uveden v textu. Převzato z (Jonkman & Kenny, 2013)

Zvláštní roli při vzniku závislosti hrají molekuly miR-29b a miR-124. Tyto molekuly jsou opakovaně identifikovány jako down-regulované různými drogami, což by mohlo nasvědčovat tomu, že by mohly sehrávat roli při vzniku závislosti nějakou obecnější roli (Chandrasekar & Dreyer, 2009; Zhu et al., 2015).

3.4.2 lncRNAs

V posledních letech se výrazně množí studie poukazující na možnou roli těchto molekul při vzniku závislosti na mnoha různých látkách, například na kokainu či amfetaminu (Bu et al., 2012; Zhu et al., 2015). Ze závěrů těchto studií vyplývá, že užívání těchto látek mění velmi výrazně expresi mnoha set až tisíců různých lncRNAs. V obou studiích byly nalezeny lncRNA ovlivňující genovou expresi pomocí *cis*- i *trans*- působení. Obě studie pozorovaly po podání stimulantů častěji down-regulaci exprese lncRNAs. Zajímavé je, že při porovnání obou studií identifikujeme 125 společných lncRNAs, jejichž exprese byla výrazně ovlivněna po podání kokainu i AMPH.

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosud známé poznatky o uplatnění epigenetických mechanismů při vzniku závislosti na psychostimulantech. Z výše uvedených studií a poznatků zcela jasně vyplývá, že epigenetických mechanismů přispívajících ke vzniku závislosti je celá řada a že jsme teprve na počátku jejich odhalování a mnoho mechanismů nám je stále ještě skryto. Jejich odhalením bychom si mohli otevřít nové cesty k léčbě závislostí a také bychom dospěli k hlubšímu pochopení fungování celého mechanismu.

Psychostimulanty jsou schopné spustit signální kaskádu vedoucí k fosforylaci CREB proteinu, což je významný transkripční aktivátor působící acetylaci histonů například v promotoru pro c-Fos protein. Hyperacetylace histonu H4 a fosfoacetylace histonu H3 v promotorových oblastech genu pro c-Fos patří mezi hlavní pozorované změny genové exprese následující v podstatě ihned po podání drogy. Tímto mechanismem nastává zvýšení exprese proteinu c-Fos. Při dlouhodobém užívání jeho exprese opět klesá na běžnou hladinu a je vystřídán proteinem Δ FosB, což je kratší sestříhová varianta proteinu FosB a je považován za jeden z hlavních indikátorů vzniku závislosti. Δ FosB se následně po několika týdnech hromadí, protože má velmi dlouhou životnost. Další faktor významný při vzniku závislosti, MeCP2, je také psychostimulanty aktivován díky jejich schopnosti spouštět signální kaskádu vedoucí k jeho fosforylaci. MeCP2 se následně účastní na vzniku behaviorální senzitivace, která u uživatelů přetrvává řadu měsíců. Při vzniku závislosti na kokainu navíc hladina MeCP2 koreluje s hladinou BDNF – tyto dva faktory dohromady přispívají ke ztrátě kontroly uživatele nad drogou, protože BDNF zesiluje po užití drogy aktivitu centra odměn v mozku.

Zajímavá je možnost uplatnění ncRNA, které tvoří další cestu ovlivnění genové exprese. Jejich role je však z většiny stále ještě velmi nejasná a zaslouží si pozornost v dalších výzkumech zaměřených na odhalování mechanismů drogové závislosti.

Seznam použité literatury

Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou (*)

- Abuhatzira, L., Makedonski, K., Kaufman, Y., Razin, A., & Shemer, R. (2007). MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. *Epigenetics*, 2(4). <https://doi.org/10.4161/epi.2.4.5212>
- Anderson, K. D., Alderson, R. F., Altar, C. A., DiStefano, P. S., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M., & Wiegand, S. J. (1995). Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *Journal of Comparative Neurology*, 357(2). <https://doi.org/10.1002/cne.903570209>
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*, 35(12). <https://doi.org/10.1038/npp.2010.128>
- Anier, K., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2013). S-Adenosylmethionine modifies cocaine-induced DNA methylation and increases locomotor sensitization in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(9). <https://doi.org/10.1017/S1461145713000394>
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. I. C., Love, W. E., & Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10148>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384(6610). <https://doi.org/10.1038/384641a0>
- Barrot, M., Olivier, J. D. A., Perrotti, L. I., DiLeone, R. J., Berton, O., Eisch, A. J., Impey, S., Storm, D. R., Neve, R. L., Yin, J. C., Zachariou, V., & Nestler, E. J. (2002). CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.172091899>
- *Barth, T. K., & Imhof, A. (2010). Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006>
- *Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. In *Genes and Development* (Vol. 16, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/gad.947102>

- *Bird, A. P., & Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. In *Cell* (Vol. 99, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81532-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81532-9)
- Black, Y. D., Maclaren, F. R., Naydenov, A. V., Carlezon, W. A., Baxter, M. G., & Konradi, C. (2006). Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. *Journal of Neuroscience*, 26(38). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2391-06.2006>
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Hervé, D., Darragh, J., Corvol, J. C., Pages, C., Simon, A. J., Girault, J. A., & Caboche, J. (2005). Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 25(49). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1711-05.2005>
- Brecht, M. L., & Herbeck, D. (2014). Time to relapse following treatment for methamphetamine use: A long-term perspective on patterns and predictors. *Drug and Alcohol Dependence*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.02.702>
- Bu, Q., Hu, Z., Chen, F., Zhu, R., Deng, Y., Shao, X., Li, Y., Zhao, J., Li, H., Zhang, B., Lv, L., Yan, G., Zhao, Y., & Cen, X. (2012). Transcriptome analysis of long non-coding RNAs of the nucleus accumbens in cocaine-conditioned mice. *Journal of Neurochemistry*, 123(5). <https://doi.org/10.1111/jnc.12006>
- Butcher, S. P., Fairbrother, I. S., Kelly, J. S., & Arbuthnott, G. W. (1988). Amphetamine-Induced Dopamine Release in the Rat Striatum: An In Vivo Microdialysis Study. *Journal of Neurochemistry*, 50(2). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02919.x>
- *Carvelli et. al, L. (2015). The Epigenetic Mechanisms of Amphetamine. *Journal of Addiction & Prevention*, SI(1). <https://doi.org/10.13188/2330-2178.s100001>
- Cassel, S., Carouge, D., Gensburger, C., Anglard, P., Burgun, C., Dietrich, J. B., Aunis, D., & Zwiller, J. (2006). Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Molecular Pharmacology*, 70(2). <https://doi.org/10.1124/mol.106.022301>
- Chandrasekar, V., & Dreyer, J. L. (2009). microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(4). <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.08.009>
- Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S., & Jaenisch, R. (2006). The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*, 49(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.027>
- Chen, J., Kelz, M. B., Hope, B. T., Nakabeppu, Y., & Nestler, E. J. (1997). Chronic fos-related antigens: Stable variants of Δ FosB induced in brain by chronic treatments. *Journal of*

- Neuroscience*, 17(13). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-04933.1997>
- Cheung, E., Zarifyan, A. S., & Kraus, W. L. (2002). Histone H1 Represses Estrogen Receptor α Transcriptional Activity by Selectively Inhibiting Receptor-Mediated Transcription Initiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(8). <https://doi.org/10.1128/mcb.22.8.2463-2471.2002>
- *Cosgrove, M. S. (2007). Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 4, Issue 4). <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.465>
- Cubells, J. F., Rayport, S., Rajendran, G., & Sulzer, D. (1994). Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *Journal of Neuroscience*, 14(4). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-04-02260.1994>
- *De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & Van Kuilenburg, A. B. P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. In *Biochemical Journal* (Vol. 370, Issue 3). <https://doi.org/10.1042/BJ20021321>
- Deneau, G., Yanagita, T., & Seevers, M. H. (1969). Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia*, 16(1). <https://doi.org/10.1007/bf00405254>
- Deng, H., Bao, X., Cai, W., Blacketer, M. J., Belmont, A. S., Girton, J., Johansen, J., & Johansen, K. M. (2008). Ectopic histone H3S10 phosphorylation causes chromatin structure remodeling in *Drosophila*. *Development*, 135(4). <https://doi.org/10.1242/dev.015362>
- Deng, J. V., Rodriguiz, R. M., Hutchinson, A. N., Kim, I. H., Wetsel, W. C., & West, A. E. (2010). MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nature Neuroscience*, 13(9). <https://doi.org/10.1038/nn.2614>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- *Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05906.x>
- Eyerman, D. J., & Yamamoto, B. K. (2005). Lobeline attenuates methamphetamine-induced changes in vesicular monoamine transporter 2 immunoreactivity and monoamine depletions in the striatum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(1). <https://doi.org/10.1124/jpet.104.072264>

- Filip, M., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Gołda, A., Frankowska, M., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2006). Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Research*, 1071(1).
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.099>
- *Fleckenstein, A. E., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2000). Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: Pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 406, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00639-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00639-7)
- *Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105140>
- *Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. In *Heredity* (Vol. 105, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>
- Goodwin, J. S., Larson, G. A., Swant, J., Sen, N., Javitch, J. A., Zahniser, N. R., De Felice, L. J., & Khoshbouei, H. (2009). Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M805298200>
- Graybiel, A. M., Moratalla, R., & Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6912>
- *Guy, J., Cheval, H., Selfridge, J., & Bird, A. (2011). The role of MeCP2 in the brain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154121>
- *Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J., & Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present - A pharmacological and clinical perspective. In *Journal of Psychopharmacology* (Vol. 27, Issue 6). <https://doi.org/10.1177/0269881113482532>
- Hendrich, B., & Bird, A. (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11).
<https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6538>
- *Henry, J. P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M. F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J., & Gasnier, B. (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *Journal of Experimental Biology*, 196.

- Hollander, J. A., Im, H. I., Amelio, A. L., Kocerha, J., Bali, P., Lu, Q., Willoughby, D., Wahlestedt, C., Conkright, M. D., & Kenny, P. J. (2010). Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, 466(7303). <https://doi.org/10.1038/nature09202>
- Hope, B. T., Nye, H. E., Kelz, M. B., Self, D. W., Iadarola, M. J., Nakabeppu, Y., Duman, R. S., & Nestler, E. J. (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron*, 13(5). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90061-2)
- *Hossain, M. K., Hassanzadeganroudsari, M., Nurgali, K., & Apostolopoulos, V. (2020). Vaccine development against methamphetamine drug addiction. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 19, Issue 12). <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1857738>
- *Howell, L. L., & Kimmel, H. L. (2008). Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochemical Pharmacology*, 75(1). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.003>
- Im, H. I., Hollander, J. A., Bali, P., & Kenny, P. J. (2010). MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nature Neuroscience*, 13(9). <https://doi.org/10.1038/nn.2615>
- *Johnson, R. G. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: A model for hormone and neurotransmitter transport. In *Physiological Reviews* (Vol. 68, Issue 1). <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.1.232>
- *Jonkman, S., & Kenny, P. J. (2013). Molecular, cellular, and structural mechanisms of cocaine addiction: A key role for MicroRNAs. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 38, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/npp.2012.120>
- Kalda, A., Heidmets, L. T., Shen, H. Y., Zharkovsky, A., & Chen, J. F. (2007). Histone deacetylase inhibitors modulates the induction and expression of amphetamine-induced behavioral sensitization partially through an associated learning of the environment in mice. *Behavioural Brain Research*, 181(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.027>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D. R., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., Van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>
- Khoshbouei, H., Sen, N., Guptaroy, B., Johnson, L., Lund, D., Gnegy, M. E., Galli, A., & Javitch, J. A. (2004). N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. *PLoS Biology*, 2(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020078>

- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F., & Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90628-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90628-C)
- Konradi, C., Cole, R. L., Heckers, S., & Hyman, S. E. (1994). Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *Journal of Neuroscience*, 14(9). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05623.1994>
- *Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184(4139). <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>
- *Kornienko, A. E., Guenzl, P. M., Barlow, D. P., & Pauler, F. M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. In *BMC Biology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-59>
- Kuhar, M. J., Ritz, M. C., & Boja, J. W. (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 14, Issue 7). [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90141-G](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90141-G)
- Kumar, A., Choi, K. H., Renthal, W., Tsankova, N. M., Theobald, D. E. H., Truong, H. T., Russo, S. J., LaPlant, Q., Sasaki, T. S., Whistler, K. N., Neve, R. L., Self, D. W., & Nestler, E. J. (2005). Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*, 48(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.023>
- Lee, Hayes, J. J., Pruss, D., & Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90051-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90051-Q)
- *Lee, Smith, E., & Shilatifard, A. (2010). The Language of Histone Crosstalk. In *Cell* (Vol. 142, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.011>
- *Lee, & Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: One size doesn't fit all. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrm2145>
- Levine, A. A., Guan, Z., Barco, A., Xu, S., Kandel, E. R., & Schwartz, J. H. (2005). CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.0509735102>
- Loewer, S., Cabili, M. N., Guttman, M., Loh, Y. H., Thomas, K., Park, I. H., Garber, M., Curran, M., Onder, T., Agarwal, S., Manos, P. D., Datta, S., Lander, E. S., Schlaeger, T. M., Daley, G. Q., & Rinn, J. L. (2010). Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human

- induced pluripotent stem cells. *Nature Genetics*, 42(12). <https://doi.org/10.1038/ng.710>
- *Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. In *Neuron* (Vol. 35, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Mantle, T. J., Tipton, K. F., & Garrett, N. J. (1976). Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, 25(18). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(76\)90432-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(76)90432-9)
- McClung, C. A., & Nestler, E. J. (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and Δ FosB. *Nature Neuroscience*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/nn1143>
- *Nestler, E. J., Barrot, M., & Self, D. W. (2001). Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.191352698>
- *Pattaroni, C., & Jacob, C. (2013). Histone methylation in the nervous system: functions and dysfunctions. In *Molecular neurobiology* (Vol. 47, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8376-4>
- *Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. In *Cell* (Vol. 136, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.006>
- *Ragione, F. Della, Vacca, M., Fioriniello, S., Pepe, G., & D'Esposito, M. (2016). MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Briefings in Functional Genomics*, 15(6). <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw023>
- Riddle, E. L., Topham, M. K., Haycock, J. W., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2002). Differential trafficking of the vesicular monoamine transporter-2 by methamphetamine and cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 449(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01985-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01985-4)
- Ritz, M. C., Cone, E. J., & Kuhar, M. J. (1990). Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: A structure-activity study. *Life Sciences*, 46(9). [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90132-B](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90132-B)
- Ritz, Mary C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., & Michael J., K. (1988). Cocaine self-administration appears to be mediated by dopamine uptake inhibition. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 12(2–3). [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(88\)90040-1](https://doi.org/10.1016/0278-5846(88)90040-1)
- *Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. In *Brain Research Reviews* (Vol. 18, Issue 3).

[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)

- Robinson, T. E., & Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *Journal of Neuroscience*, 17(21). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-21-08491.1997>
- Rothman, R. B., Baumann, M. H., Dersch, C. M., Romero, D. V., Rice, K. C., Carroll, F. I., & Partilla, J. S. (2001). Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, 39(1). [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20010101\)39:1<32::AID-SYN5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20010101)39:1<32::AID-SYN5>3.0.CO;2-3)
- Rotllant, D., & Armario, A. (2012). Brain pattern of histone H3 phosphorylation after acute amphetamine administration: Its relationship to brain c-fos induction is strongly dependent on the particular brain area. *Neuropharmacology*, 62(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.019>
- Shahbazian, M. D., Antalffy, B., Armstrong, D. L., & Zoghbi, H. Y. (2002). Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Human Molecular Genetics*, 11(2). <https://doi.org/10.1093/hmg/11.2.115>
- *Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 68). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.821>
- Shen, H. Y., Kalda, A., Yu, L., Ferrara, J., Zhu, J., & Chen, J. F. (2008). Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and Δ FosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. *Neuroscience*, 157(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.019>
- Sim, M. S., Soga, T., Pandey, V., Wu, Y. S., Parhar, I. S., & Mohamed, Z. (2017). MicroRNA expression signature of methamphetamine use and addiction in the rat nucleus accumbens. *Metabolic Brain Disease*, 32(6). <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0061-x>
- *Simola, N., & Carta, M. (2016). Amphetamine Usage, Misuse, and Addiction Processes: An Overview. In *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800212-4.00002-9>
- Sulzer, D., & Rayport, S. (1990). Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: A mechanism of action. *Neuron*, 5(6). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90339-H](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90339-H)
- *Szerlong, H. J., & Hansen, J. C. (2011). Nucleosome distribution and linker DNA: Connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. In *Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 89,

Issue 1). <https://doi.org/10.1139/O10-139>

- Thomas, J. O., & Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.72.7.2626>
- Volkow, N. D., Chang, L., Wang, G. J., Fowler, J. S., Ding, Y. S., Sedler, M., Logan, J., Franceschi, D., Gatley, J., Hitzemann, R., Gifford, A., Wong, C., & Pappas, N. (2001). Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: Association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 158(12). <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.12.2015>
- Volkow, N. D., Chang, L., Wang, G. J., Fowler, J. S., Franceschi, D., Sedler, M., Gatley, S. J., Miller, E., Hitzemann, R., Ding, Y. S., & Logan, J. (2001). Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *Journal of Neuroscience*, 21(23). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-23-09414.2001>
- Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J., & Ma, L. (2010). Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKII α in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, 35(4). <https://doi.org/10.1038/npp.2009.193>
- *Waterland, R. A. (2006). Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *Journal of Pediatrics*, 149(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.06.064>
- Young, S. T., Porrino, L. J., & Iadarola, M. J. (1991). Cocaine induces striatal c-Fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1291>
- Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., & Montminy, M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.0501076102>
- Zhu. (2015). Methamphetamine induces alterations in the long non-coding RNAs expression profile in the nucleus accumbens of the mouse. *BMC Neuroscience*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0157-3>
- Zhu, L., Zhu, J., Liu, Y., Chen, Y., Li, Y., Chen, S., Li, T., Dang, Y., & Chen, T. (2015). Chronic methamphetamine regulates the expression of MicroRNAs and putative target genes in the

nucleus accumbens of mice. *Journal of Neuroscience Research*, 93(10).
<https://doi.org/10.1002/jnr.23605>

Zorick, T., Nestor, L., Miotto, K., Sugar, C., Hellemann, G., Scanlon, G., Rawson, R., & London, E. D. (2010). Withdrawal symptoms in abstinent methamphetamine-dependent subjects. *Addiction*, 105(10). <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03066.x>

Internetové zdroje:

[I] European Drug Report 2020: Trends and Developments | www.emcdda.europa.eu. EMCDDA home page | www.emcdda.europa.eu [online]. Dostupné z: https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2020_en

[citováno 2021-04-04]

[II] With the help of a suitable diagram describe the structure of a nucleosome. - Sarthaks eConnect | Largest Online Education Community. Sarthaks eConnect | Largest Learning Platform [online]. Dostupné z: <https://www.sarthaks.com/215850/with-the-help-of-a-suitable-diagram-describe-the-structure-of-a-nucleosome>

[cit. 2021-07-16]

[III] World Drug Report 2021. United Nations Office on Drugs and Crime [online]. Dostupné z: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html>

[cit. 2021-07-18]